

ВЛИЯНИЕ НИТРОЗОЦИСТЕИНА НА СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ IN VITRO

Степура Т.Л.

Государственный медицинский университет, г. Гродно

Presence various nitric oxide adducts of hemoglobin in blood shifts oxyhemoglobin dissociation curve (ODC) in an opposite directions: S-nitrosohemoglobin and methemoglobine – to the left, nitrosylhemoglobin – to the right [Patel R.P. et al., 1999]. We assume that nitric oxide (NO) may be involved into the regulation of hemoglobin oxygen affinity (HOA).

In our experiments in vitro we had studied the influence of NO-donor – S-nitrosocystein in different concentrations on the HOA. Significant changes of HOA were obtained in the experiments when blood was mixed with S-nitrosocystein (molar ratio of Hb (tetramer): NO = 2:1 or 4:1) and then was exposed to the oxygenation by respective gases mixture. The amounts of met-Hb in these samples significantly increased. However this NO-donor during deoxygenation did not modify HOA despite the increase of met-Hb amounts. The shift of oxyhemoglobin dissociation curve during oxygenation is in agreement with a fact that presence in the blood of met-Hb decreases the HOA [Gow A.J. et al., 1999]. However the same changes in met-Hb concentrations in the deoxygenated samples do not provoke deviation in p50. This fact may be explained by formation of nitrosylhemoglobin that is generated mainly under the low oxygenated conditions. It is known that this NO-adduct of hemoglobin shifts ODC into the right and compensates met-Hb effect on HOA [McMahon T. J. et al., 2000]. The obtained results of our experiments confirm our hypothesis about NO involvement in the regulation of HOA.

Известно, что оксид азота (NO) способен образовывать с гемоглобином различные соединения. Роль гемоглобина во взаимодействии с этой молекулой заключается в элиминации, депонировании и транспорте высоко реакционной молекулы NO. Оксид азота в свою очередь можно рассматривать в качестве модулятора кислородсвязывающих свойств гемоглобина [Зинчук В.В., 2003]. С дезоксигемоглобином оксид азота образует нитрозилгемоглобин, присутствие которого уменьшает сродство гемоглобина к кислороду (СГК) всей крови. Взаимодействие NO с оксигенированным гемоглобином приводит к образованию метгемоглобина и S-нитрозогемоглобина, которые, в свою очередь, увеличивают СГК крови [Gladwin T.M. et al., 2002; McMahon T. J. et al., 2000].

Основной целью нашего эксперимента было оценить влияние различных концентраций нитрозоцистеина (донора оксида азота) на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro* при инкубировании в условиях оксигенации или дезоксигенации крови.

Материалы и методы исследования

Во всех экспериментах использовалась гепаринизированная кровь, забранная от кроликов средней массой от 3,5 до 4,5 кг, в количестве 14. Забор смешанной венозной крови проводился у наркотизированных тиопенталом (50 мг/кг) животных посредством катетеризации яремной вены. Сразу после изъятия кровь хранилась в анаэробных условиях при температуре +1⁰С. Все исследования проводились в течение первых 5-6 часов после забора.

Первоначально образцы крови поочередно инкубировали с нитрозоцистеином в двух различных сатураторах. В одном из них проводили насыщение крови оксигенирующей смесью, состоящей из 94,5% O₂ и 5,5% CO₂, а в другом – дезоксигенирующей, следующего состава: 94,5% N₂ и 5,5% CO₂. Используемое количество донора в этом эксперименте было в 2 раза меньше концентрации гемоглобина в крови. Во второй серии нитрозоцистеин вводили в предварительно оксигенированную или дезоксигенированную в течение 30 минут кровь. Концентрация образующегося из нитрозоцистеина оксида азота в данном опыте была равна 1:2 или 1:4 количества гемоглобина в пробе. Время инкубирования крови с донором составляло 30 минут. Во всех опытах в контрольной пробе кровь смешивали с изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия.

Нитрозоцистеин (0,5 М) готовили непосредственно перед использованием путем смешивания 1 М водного раствора нитрита натрия и 1 М раствора L-цистеина гидрохлорида, растворенного в 0,5 н. растворе соляной кислоты с добавлением 0,5 мМ ЭДТА. Перед добавлением в кровь полученный нитрозоцистеин разводили до нужной концентрации фосфатным буфером (pH = 7,4), содержащим 0,5 мМ ЭДТА [McMahon, T. J., Stamler, J.S., 1999].

Сразу после окончания инкубирования методом смешивания с помощью микроанализатора ABL-330 ("Radiometer") оценивали сродство гемоглобина к кислороду по показателям: p50 стандартное (измеренное при pH = 7,4, pCO₂ = 40 мм рт. ст., t = 37⁰С) и реальное (при реальных значениях pCO₂, pH, t). В плазме и эритроцитарной массе проинкубированной крови измеряли концентрацию метгемоглобина [Кушаковский М.С., 1968] и суммарное количество нитритов по методу Грисса [Schulz K. et al., 1999]. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерной программы "Statistica".

Результаты и их обсуждение

В первой серии эксперимента вводили нитрозоцистеин в соответствующий сатуратор в соотношении выделяющегося оксида азота и гемоглобина (тетрамера) 1:2. Значение $p50$ стандартного было ниже на $3,9 \pm 0,70$ мм рт. ст. в крови, смешанной с нитрозоцистеином и подвергавшейся оксигенации. Реальный показатель сродства в этом случае был ниже на $3,4 \pm 0,95$ мм рт. ст. При оксигенации количество метгемоглобина в пробе увеличивалось на 140,3 %, концентрации NO_x в плазме и эритроцитах не отличались от контроля. В условиях дезоксигенации нитрозоцистеин увеличивал количество метгемоглобина на 283,3 %, нитритов в плазме на 58,6 %, а в эритроцитах на 23,0 %. Примечательно, что изменения сродства гемоглобина к кислороду в последнем случае не наблюдалось.

В следующей серии при обоих соотношениях NO и гемоглобина изменений $p50$ реального в оксигенированной крови не наблюдалось. Однако стандартный показатель сродства был меньше на $4,2 \pm 1,13$ мм рт. ст., в случае с большей концентрацией донора, и на $2,9 \pm 0,89$ мм рт. ст. при соотношении оксида азота и гемоглобина 1:4. Прирост количества нитритов в плазме был достоверно большим на 75,7% в первом случае, и на 49,1% во втором. Увеличение концентрации метгемоглобина наблюдалось в обоих случаях, однако статистически достоверный прирост был получен только при соотношениях выделившегося оксида азота и гемоглобина 1:4 (на 78,9%). Инкубирование предварительно дезоксигенированной крови с нитрозоцистеином в концентрационном соотношении 1:2 не влияло как на стандартный показатель сродства крови, так и значение $p50$ реального. Однако количество метгемоглобина увеличивалось в данной пробе на 236,8%, а суммарная концентрация нитратов/нитритов плазмы возрастала на 35,7%. Уменьшение количества донора в два раза по сравнению с исходным соотношением снижало $p50$ стандартное на $4,4 \pm 1,39$ мм рт. ст. и не изменяло остальные показатели: $p50$ реальное, метгемоглобин, нитраты/нитриты.

Сдвиг КДО влево в условиях оксигенации согласуются с тем фактом, что присутствие метгемоглобин уменьшает СГК всей крови [Gow A.J. et al., 1999]. Однако, аналогичное изменение содержания окисленного гемоглобина в дезоксигенированной пробе не вызывает изменений $p50$ по отношению к контролю. Данный факт можно объяснить образованием другой NO-модифицированной формы гемоглобина – нитрозилгемоглобина, который преимущественно образуется в условиях низкой оксигенированности и сдвигает КДО вправо, компенсируя эффект метгемоглобина [McMahon T. J. et al., 2000]. Уменьшение соотношения нитрозоцистеина и гемоглобина до величины 1:4 в условиях дезоксигенации приводит к снижению $p50$ стандартного на фоне отсутствия достоверных изменений в содержании метгемоглобина,

суммарной концентрации нитритов в плазме и эритроцитах. Объяснение последнего факта требует проведения дальнейших исследований, раскрывающих механизм взаимодействия оксида азота и гемоглобина.

Данная работа выполнена частично благодаря финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований РБ (№ Б03-019).

Литература

1. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязующих свойств гемоглобина. // Успехи физиологических наук. – 2003, апрель-июнь, 34 (2) - с. 33-45.
2. Gladwin M.T., Wang X., Reiter Ch.D., Yang B.K., Vivas E.X., Bonaventura C., Schechter A.N. S-nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O₂/NO-linked allosteric function. // The Journal of Biological Chemistry. - V.277, No 31, August 2, 2002 - p. 27818-27828.
3. Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. // Procl. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999, Vol. 96, № 16 – pp. 9027-9032.
4. McMahon T.J., Stone A.E., Bonaventura J., Singel D.J., Stamler J.S. Functional Coupling of Oxygen Binding and Vasoactivity in S-Nitrosohemoglobin. // J. Biol. Chem. - Vol. 275, Issue 22 – June 2, 2000 – pp. 16738-16745.

Памяти Р. Росса

ЭНДОТЕЛИН-1 КАК УЧАСТНИК ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ЦИТОКИНОВОЙ СЕТИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Тепляков А.И.

***Республиканский диспансер экологической и профессиональной
патологии, г. Могилев***

Мы предполагаем, что клеточные координационные взаимодействия формируют цитокиновую сеть, которая гарантирует их мобильный баланс [1], а ее дисбаланс способствует прогрессирующему течению атеросклероза и его осложнений. Процесс развивается при воздействии любого агента, вызывающего повреждение эндотелия, которое характеризуется чрезмерной репарацией, в ответ на воздействие любого провоспалительного сигнала физической или химической природы, которое не достигает степени, вызывающей гибель клетки по типу некроза